

Anordnung zur optischen Erfassung von in einer Probe angeregter und/ oder rückgestreuter Lichtstrahlung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren in der Mikroskopie, insbesondere der Fluoreszenzmikroskopie, der Laser Scanning Mikroskopie, der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie und der Scanning Nahfeld-mikroskopie, zur Untersuchung von vorwiegend biologischen Proben, Präparaten und zugehörigen Komponenten. Mit eingeschlossen sind auf Fluoreszenzdetektion basierende Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen (High Throughput Sceening). Simultan-Untersuchungen von Proben mit Mehrfachfluorophoren in Echtzeit durch eine simultane Beleuchtung der Probe in mehreren Probenpunkten werden damit bei überlappenden Fluoreszenzspektren auch in räumlichen Strukturen von dicken Proben möglich.

Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie (Lit.: Pawley, „Handbook of biological confocal Microscopy“; Plenum Press 1995). Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Zellteilen verwendet.

Die eingestrahlten Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand an. Diese Anregung wird meist als Einphotonen-Absorption bezeichnet (Abb. 1a). Die so angeregten Farbstoffmoleküle können auf verschiedene Weise in den Grundzustand zurückgelangen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist der Übergang unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons am wichtigsten. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist aufgrund der Stokesverschiebung im Vergleich zur Anregungsstrahlung generell rot verschoben, besitzt also eine größere Wellenlänge. Die Stokesverschiebung ermöglicht die Trennung der Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung.

Das Fluoreszenzlicht wird mit geeigneten dichroitischen Strahlteilern in Kombination mit Blockfiltern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt beobachtet. Dadurch ist die Darstellung einzelner, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteilen, möglich. Grundsätzlich können jedoch auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen sich spezifisch anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden (Mehrfachfluoreszenz). Zur Unterscheidung, der von den einzelnen Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzsignale, werden wiederum spezielle dichroitischen Strahlteiler verwendet.

Neben der Anregung der Farbstoffmoleküle mit einem hoch energetischen Photon (Einphotonen-Absorption) ist auch eine Anregung mit mehreren Photonen geringerer Energie möglich (Abb. 1b). Die Summe der Energien der Einzelphotonen entspricht hierbei ungefähr einem Vielfachen des hochenergetischen Photons. Diese Art der Anregung der Farbstoffe wird als Mehrphotonen-Absorption bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Die Farbstoffemission wird durch diese Art der Anregung jedoch nicht beeinflusst, d.h. das Emissionsspektrum erfährt bei der Mehrphotonen-Absorption einen negativen Stokesshift, besitzt also eine geringere Wellenlänge im Vergleich zur Anregungsstrahlung. Die Trennung der Anregungs- von der Emissionsstrahlung erfolgt in der gleichen Art und Weise wie bei der Einphotonen-Absorption.

Der Stand der Technik soll im folgenden beispielhaft anhand eines konfokalen Laser-Scanning- Mikroskopes (LSM) erläutert werden (Abb. 2).

Ein LSM gliedert sich im wesentlichen in 4 Module: Lichtquelle, Scanmodul, Detektionseinheit und Mikroskop. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE19702753A1 verwiesen.

Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptions-

eigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Die Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z.B. durch den Einsatz eines akusto-optischen Kristalls. Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul.

Die in der Lichtquelle erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scanoptik und die Tubuslinse in das Präparat fokussiert. Die Scanner rastern punktförmig die Probe in x-y-Richtung ab. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden.

Bei einer konfokalen Detektion (descanned Detektion) des Fluoreszenzlichtes, gelangt das Licht, das aus der Fokusebene (Specimen) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MDB). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende (konfokale Blende / Pinhole) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punktdetektors (PMT) gemessen.

Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen in dem die Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokalen Blende kann somit entfallen und die Detektion kann direkt nach dem Objektiv erfolgen (non descanned Detektion).

In einer weiteren Anordnung zur Detektion einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descanned Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektives in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descanned Detektion).

Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch beide Detektionsanordnungen in Verbindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wiedergegeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden.

Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissionseigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, daß nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

In biomedizinischen Applikationen werden zur Zeit mehrere verschiedene Zellregionen mit verschiedenen Farbstoffen gleichzeitig markiert (Multifluoreszenz). Die einzelnen Farbstoffe können mit den Stand der Technik entweder aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften oder Emissionseigenschaften (Spektren) getrennt nachgewiesen werden.

Zum getrennten Nachweis erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung des Fluoreszenzlichts von mehreren Farbstoffen mit den Nebenstrahlteilern (DBS) und eine getrennte Detektion der einzelnen Farbstoffemissionen in verschiedenen Punktdetektoren (PMT x).

Durchflußzytometer dienen der Untersuchung und der Klassifikation von Zellen und anderen Partikeln. Die Zellen befinden sich hierzu in einer Flüssigkeit gelöst und werden durch eine Kapillare gepumpt. Zur Untersuchung der Zellen wird ein Laserstrahl von der Seite in die Kapillare fokussiert. Die Zellen sind mit verschiedenen Farbstoffen oder

fluoreszierenden Biomolekülen gefärbt. Gemessen wird das angeregte Fluoreszenzlicht und das rückgestreute Anregungslicht. Die Trennung des Fluoreszenzsignals der Probe von dem Anregungslicht erfolgt mittels dichroitischen Strahlteilern (MDB siehe Abb. 2). Der Stand der Technik ist in „Flow Cytometry and Sorting“, Second Edition, M.R. Melamed, T. Lindmo, M.L. Mendelsohn, Eds. Wiley & Sons, Inc. New York, 1990, pp 81-107 beschrieben.

Aus dem rückgestreuten Signal kann die Größe der Zellen bestimmt werden. Mit Hilfe der Spektraleigenschaften der Fluoreszenz einzelner Zellen können verschiedene Zellen separiert/sortiert oder getrennt gezählt werden. Die Sortierung der Zellen erfolgt mit einem elektrostatischen Feld in verschiedene Kapillaren. Das Ergebnis, d.h. z.B. die Anzahl der Zellen mit Farbstoff A im Vergleich zu Zellen mit Farbstoff B wird häufig in Histogrammen dargestellt. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt typischerweise einige 10-100 cm/s. Deshalb wird eine hochempfindliche Detektion benötigt. Zur Einschränkung des Detektionsvolumens erfolgt nach dem Stand der Technik eine konfokale Detektion.

Statt eines Punktscanners werden nach dem Stand der Technik auch so genannte Linienscanner verwendet (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach Abb. 2. Jedoch wird statt eines Punktfokus eine Linie in die Probe (3) abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung (x oder y) gescannt. Durch das Scannen einer Linie anstatt eines Punktes kann die Bildaufnahmerate erheblich vergrößert werden. Somit kann dieses Scanverfahren zur Beobachtung von schnell ablaufenden Prozessen in Echtzeit (Echtzeitmikroskopie) verwendet werden. Jedoch ist die optische axiale Auflösung ca. um einen Faktor 1.4 schlechter als beim Punktscanner.

In einer weiteren Anordnung zur Echtzeitmikroskopie nach dem Stand der Technik wird das komplette zu untersuchende Feld mittels einer aufgeweiteten Lichtquelle beleuchtet. Jedoch werden nur spezielle Punktmuster des gesamten zu scannenden Feldes durch eine sich schnell

drehende Scheibe freigegeben. Diese Verfahren werden in der Literatur meist als Nipkow-Disk Verfahren bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996).

In einem weiteren Verfahren nach dem Stand der Technik, der sogenannten strukturierten Beleuchtung (siehe Abb. 3), nutzt man die Modulationstiefe der optischen Abbildung einer Amplitudenstruktur (z.B. Gitter) als Kriterium für die Tiefenschärfe. Das Bild der periodischen Struktur zeichnet sich durch die Frequenz der Modulation und die Phasenstellung (Bildphase) der Modulation aus. Durch eine Phasenverschiebung der Struktur senkrecht zur optischen Achse können unterschiedliche Projektionsszenarien erhalten werden. Um streifenfreie, tiefendiskriminierte optische Schnitte berechnen zu können, werden im allgemeinen mindestens 3 Phasenbilder PB bei 0°, 120° und 240° benötigt. Diese Phasenbilder (PB) werden anschließend zu einem (konfokalen) optischen Schnittbild in einem Image Prozessor mit folgender Formel verrechnet:

$$I_{Section}(x) = Const \cdot \sqrt{(I(x,0^\circ) - I(x,120^\circ))^2 + (I(x,120^\circ) - I(x,240^\circ))^2 + (I(x,0^\circ) - I(x,240^\circ))^2},$$

wobei $I(x, Winkel)$ die Intensität am jeweiligen Pixel in dem entsprechenden Phasenbild beschreibt.

Die Aufzeichnung der 3 oder mehr Phasenbilder erfolgt im einfachsten Falle sequentiell. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die Probe während der Messung der Bilder nicht bewegt. Die so aus den Phasenbildern berechneten Schnittbilder bzw. Schnittstapel können anschließend mittels 3-D Auswertesoftware auf einem Standard PC und Monitor dargestellt werden.

Die Ortsauflösung entlang der optischen Achse hängt von der Wellenlänge des Lichtes, der numerischen Apertur des Objektivs und der Modulationsfrequenz ab.

Für eine detaillierte Beschreibung des Berechnungsalgorithmus wird auf T. Wilson et al.; „Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope“; Optics Letters 22 (24) 1997 verwiesen.

Anordnungen zum Screenen von Farbstoffen wie z.B. in so genannten Chipreadern ähneln in ihrem optischen Aufbau einem Laser Scanning

Mikroskop. Sie scannen jedoch ein deutlich größeres Bildfeld zur Untersuchung der makroskopischen Proben, beispielsweise Screenen von Wirkstoffen auf einem Biochip. Die Kantenlänge der Scanfelder betragen hierbei einige 10 mm. Diese Scanfelder können z.B. durch eine Vergrößerung der Scanwinkel der Galvoscaner, durch eine Anordnung der Probe in einem Zwischenbild der Mikroskopanordnung beispielhaft in Fig. 6A oder durch eine spezielle Objektivanordnung (Makroobjektiv), die das Zwischenbild vergrößert auf die Probe abbildet, erzielt werden.

Die Trennung des Anregungslichtes vom von der Probe emittierten Licht erfolgt nach dem Stand der Technik durch spektrale Trennung unter Ausnutzung des Stokesshiftes, durch eine Einschränkung der numerischen Apertur der zur Probenbeleuchtung/-detektion verwendeten Optiken oder durch eine Aufteilung in verschiedene Polarisationsrichtungen.

Zur spektralen Trennung des Anregungslichts vom von der Probe emittierten Licht werden spezielle dichroitische Strahlteiler verwendet. Diese sind meist, wie in Abb. 3a gezeigt, so ausgelegt, dass sie möglichst effizient das Anregungslicht reflektieren und das von der Probe emittierte Licht möglichst effizient transmittieren. Dargestellt ist der Reflexionsgrad (Reflektivität) in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Bei Verwendung von polarisiertem Anregungslicht beträgt die minimale spektrale Bandbreite (s) des reflektierten Wellenlängenbereiches ca. 10 nm, wobei die Flankensteilheit (f) meist >5 nm ist. Somit kann nach dem Stand der Technik mit einem dichroitischen Strahlteiler bei Verwendung einer Anregungswellenlänge, das von der Probe emittierte Licht, effizient getrennt werden. Jedoch verschlechtert sich die Effizienz bei simultaner Anregung mehrerer Farbstoffe mit mehreren Wellenlängen (Multifluoreszenzmikroskopie), da es meist zu einer spektralen Überlappung des Anregungslichtes und des emittierten Lichtes kommt. Weiterhin muß bei Verwendung verschiedener Farbstoffe mit verschiedenen Absorptionseigenschaften jedesmal ein spezieller Strahlteiler kreiert werden. In einem Weitfeldmikroskop erfolgt meist eine breitbandige Anregung der Probe mit Licht einer Weißlichtquelle, wobei sich teilweise die Anregungs- und die emittierte Strahlung spektral überlagern. Somit kommt es bei Verwendung

von dichroitischen Strahlteilern nach dem Stand der Technik zu einer schlechten Effizienz der Trennung von Anregungslicht und emittierten Licht.

Die Trennung des Anregungslichtes vom emittierten Licht durch Einschränkung der numerischen Apertur der Probenbeleuchtungsoptik (4 in Abb. 3b) kann beispielsweise durch eine Beleuchtung der Probe mit eingeschränkter Apertur erfolgen, so dass nur die achsnahen Strahlen (1) in Richtung zur Probe (2) gelangen. Da die Emission in alle Raumrichtungen erfolgt, kann im verbleibenden Aperturbereich dieses Licht der Probe (2) aufgesammelt werden. Die Trennung des Anregungslichts vom emittierten Licht erfolgt anschließend mit einem teilweise voll verspiegelten (schwarzer Bereich) Planplatte (3). Die Detektion des von der Probe emittierten Lichts erfolgt in Strahlrichtung (5). Nachteilig bei den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Teilung der numerischen Apertur ist, dass durch die Einschränkung der Apertur zum einen die Effizienz der Detektion und zum anderen die optische Auflösung der Anordnung verschlechtert werden. Beide Parameter sind hierbei miteinander verkoppelt. Will man beispielsweise eine hohe Effizienz der Trennung erzielen, so verschlechtert sich die optische Auflösung.

Bei einer Anregung der Probe (2) mit polarisiertem Licht (1 in Abb. 3c) kann eine Trennung des emittierten Lichtes (5), das nicht polarisiert ist, mit einem Polarisationssteiler (3) erfolgen. Hierbei wird jedoch nur maximal 50% des gesamten von der Probe emittierten Lichtes detektiert.

Nachteilig bei allen Verfahren nach dem Stand der Technik ist, dass die Trennung des Anregungslichtes vom von der Probe emittierten Licht wellenlängenabhängig oder mit eingeschränkter Effizienz typischerweise 70% bis 90% - abhängig von den geforderten Spekraleigenschaften und der Anzahl der Beleuchtungslinien - erfolgt. Zusätzlich sind die Verfahren nach dem Stand der Technik zum Einsatz in optischen Systemen bei denen die Strahlen die optischen Elemente zur Trennung mit einer starken Neigung treffen nicht geeignet, da sich hierdurch z.B. bei einem dichroitischen

Strahlteiler die Spektraleigenschaften verändern oder bei einem Polarisationssteiler die Effizienz der Polarisationsaufteilung verschlechtert.

Erfindungsgemäß werden Verfahren und Anordnungen beschrieben mit denen besonders vorteilhaft das Anregungslicht von der in der Probe angeregten und/oder rückgestreuten Lichtstrahlung (z.B. Fluoreszenz / Lumineszenz) mit hoher Effizienz getrennt werden kann. Die Trennung ist hierbei gegenüber dem Stand der Technik nicht wellenlängenabhängig und ist deshalb insbesondere für den Einsatz in der Multifluoreszenzmikroskopie, d.h. zur simultanen Anregung verschiedener Farbstoffe besonders geeignet. Somit ist eine schnelle Umschaltung zwischen mehreren Anregungswellenlängen bzw. spektralen Detektionswellenlängenbereichen – so genanntes Multitracking wie in EP977069 A2 beschrieben besonderes einfach zu realisieren. Weiterhin ist es möglich das von der Probe in Richtung Detektor gestreute Licht von dem auf direktem Wege reflektierten Licht zu separieren. Das Element zur Trennung des Anregungslichts von der in der Probe angeregten und/oder rückgestreuten Lichtstrahlung ist insbesondere zum Einbau an Stellen, an denen starke Strahlneigungswinkel auftreten geeignet. Die optische Auflösung wird durch die erfindungsgemäßen Anordnungen gegenüber Anordnungen zur Trennung des Anregungs- vom Detektionsstrahlengang nach dem Stand der Technik nicht verschlechtert. Weiterhin kann die Beleuchtungsverteilung am Ort der Probenwechselwirkung manipuliert werden. Dadurch ist es möglich so genannte Regions of Interest (ROI) in Echtzeit zu scannen. Zusätzlich können die aus der Weitfeldmikroskopie bekannten Beleuchtungsverfahren, wie z.B. eine schiefe Beleuchtung realisiert werden.

Die erfindungsgemäße Lösung ist in bildgebenden wie in analytischen Mikroskopiesystemen einsetzbar. Die Mikroskopsysteme sind bildgebende Systeme wie Laser-Scanning-Mikroskope zur dreidimensionalen Untersuchung von biologischen Präparaten mit einer optischen Auflösung bis zu 200 nm, Scanning-Nahfeld-Mikroskope zur hochaufgelösten Untersuchung von Oberflächen mit einer Auflösung von bis zu 10 nm. Fluoreszenzkorrelations-Mikroskope zur quantitativen Bestimmung von Molekülkonzentrationen und zur Vermessung von Molekül-Diffusionen.

Weiterhin sind auf Fluoreszenzdetektion basierende Verfahren zum Screenen von Farbstoffen und Verfahren zur Durchflußzytometrie eingeschlossen.

In all den o.g. Systemen werden Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Markierung der Präparate eingesetzt. Die o.g. Aufgabe wird durch Verfahren und Anordnungen gemäß den unabhängigen Patentansprüchen gelöst. Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

Durch die erfindungsgemäßen Verfahren können die Anzahl der simultan einsetzbaren Farbstoffsignaturen, d.h. die Anzahl der simultan untersuchbaren Eigenschaften beispielsweise von Zellen erhöht werden. Bei sich stark überlappenden bzw. nahe beieinander liegenden Spektralsignaturen der einzelnen Farbstoffe muß nach dem Stand der Technik der detektierte Wellenlängenbereich oder die numerische Apertur zur getrennten Detektion der Fluoreszenzsignale einzelner Farbstoffe eingeschränkt werden. Dadurch verringert sich die Empfindlichkeit der Detektion, d.h. es kommt zu einem erhöhten Rauschen der Detektoren, da höhere Verstärkungen genutzt werden müssen. Dies wird durch die erfindungsgemäßen Verfahren und Anordnungen verhindert.

Beschreibung der Erfindung

Im folgenden werden verschiedene Anordnungen näher erläutert, mit denen sich die in der Probe angeregte und/oder rückgestreute Lichtstrahlung (im folgenden Detektionslicht) besonders effizient und wellenlängenunabhängig von dem Anregungslicht trennen läßt. Die Anordnungen eignen sich somit insbesondere zum schnellen Multitracking. In der Probe angeregte Lichtstrahlung ist im folgenden Kontext Licht, welches ungerichtet vorzugsweise in einen großen Raumwinkel von der Probe abgestrahlt wird. Dies sind insbesondere in der Probe angeregtes Fluoreszenz- und Lumineszenzlicht.

1. Weitfeldmikroskop

Abb. 4A zeigt schematisch die erfindungsgemäße Anordnung für ein Weitfeldmikroskop. Bei einem Weitfeldmikroskop soll die Probe mit einer meist spektral breitbandigen Lichtquelle simultan in mehreren Punkten der Probe in dem zu untersuchenden Feld homogen beleuchtet werden. Hierzu

wird die Lichtquelle LQ in eine Pupille der Mikroskopeinrichtung, d.h. in die oder in die Nähe der rückwärtigen Brennebene des Objektives oder in einer zur rückwärtigen Brennebene des Objektives konjugierten Ebene (eingezeichnet ist die rückwärtige Brennebene P) mittels einer Optik L1 fokussiert. Durch eine weitere Optik O z.B. dem Mikroskopobjektiv, in deren rückwärtigen Brennpunkt genau P liegt, wird das Licht der Lichtquelle mit einem Parallelstrahl in die zu untersuchende Probe PR abgebildet. Die durchgezogenen Linien stellen den Beleuchtungsstrahlengang dar. Der Beobachtungsstrahlengang, z.B. bei einer Fluoreszenzanregung, ist gestrichelt eingezeichnet.

Aufgrund der Art der Probenwechselwirkung z.B. bei einer Fluoreszenz- oder Lumineszenzanregung besitzt das von der Probe abgestrahlte Licht eine geringe räumliche Kohärenz. D.h. jeder in der Probe angeregte Punkt strahlt im wesentlichen unabhängig von den benachbarten Punkten als Punktstrahler in alle Raumrichtungen ab. Die Optik O (z.B. ein Mikroskopobjektiv) bildet die einzelnen Punktstrahler gemeinsam mit der Tubuslinse TL in eine Zwischenbildebene ZB der Mikroskopeinrichtung ab, wobei die Pupille P gleichförmig von zueinander inkohärenten Wellenfronten verschiedener Ausbreitungsrichtung ausgeleuchtet wird (gestrichelter Strahlengang). In der Zwischenbildebene kann, wie aus dem Stand der Technik bekannt, eine CCD Kamera oder ein Okular zur Detektion und/ oder Betrachtung der Probe dienen. Bei Aufnahme einer Fluoreszenz oder Lumineszenz wird zur Unterdrückung des von der Probe rückgestreuten Anregungslichts ein Emissionsfilter (dichroitischer Filter) F eingeschwenkt.

In der Pupille P befindet sich das in Abb. 4B dargestellte erfindungsgemäße Element MDB, welches die Trennung von Anregungslicht und Detektionslicht vornimmt. MDB ist in dem grau gezeichneten Bereich HR voll verspiegelt. Der weiß gezeichneten Bereich HT um den Koordinatenursprung von XY ist hoch transmittierend insbesondere für den Wellenlängenbereich in dem die Probenanregung erfolgen soll. Im einfachsten Falle kann der HT Bereich ein Loch in dem sonst verspiegelten Element sein. Durch den HT Bereich wird erfindungsgemäß das Anregungslicht hindurch fokussiert. Das von der Probe auf direktem Wege reflektierte Licht gelangt wiederum insbesondere durch den HT Bereich hindurch zur Lichtquelle. Das von der Probe diffus gestreute

Anregungslicht und / oder in der Probe angeregte Licht treffen MDB entsprechend der Pupillengröße der Mikroskopoptik auf seiner gesamten Fläche, wobei der auf den HR Bereich treffende Anteil in Richtung TL abgelenkt und zur Beobachtung im Zwischenbild zur Verfügung steht. Es geht bei dieser Anordnung an MDB nur der auf den HT Bereich fallende Anteil der Detektionsstrahlung verloren. Das Verhältnis der Flächen von HT zu HR beträgt:

$$R = \frac{A_{Pupille} - A_{HT}}{A_{Pupille}} = \frac{r_{Pupille}^2 - r_{HT}^2}{r_{Pupille}^2}, \text{ wobei der Radius für den HR Bereich in}$$

einem Weitfeldmikroskop typischerweise ca. 5 mm und der HT Bereich ca. <0.5 mm betragen. Somit ergibt sich für das Verhältnis und damit für die Effizienz der Strahlaufteilung von MDB $R=99\%$. Diese Effizienz ist unabhängig von der verwendeten Wellenlänge.

Durch kleine Verschiebung der Linse L1 senkrecht zur optischen Achse kann der Winkel unter dem die Beleuchtung auf die Probe trifft variiert werden. Somit können je nach Einstellung verschiedene Beleuchtungsszenarien wie z.B: schiefe Beleuchtung oder Dunkelfeldbeleuchtung realisiert werden.

2. Weitfeldmikroskop mit Strukturierter Beleuchtung

Abb. 5A zeigt eine erfindungsgemäße Anordnung für ein Weitfeldmikroskop mit strukturierter Beleuchtung. Mit durchgezogenen Linien eingezeichnet ist der Beleuchtungsstrahlengang der Mikroskopanordnung. Der Beobachtungsstrahlengang ist gestrichelt gezeichnet. Das Licht der Lichtquelle LQ wird im Lichtquellenmodul z.B mit einem fresnelschen Biprisma FBP in 2 Teilstrahlen gleicher Intensität aufgeteilt, die sich im Zwischenbild ZB unter einem kleinen Winkel (typisch <5°) schneiden. Weitere Methoden zur Strahlaufspaltung sind aus dem Stand der Technik, beispielsweise DE19904592A1 bekannt. Durch eine Optik L1 werden die beiden Teilstrahlen jeweils an verschiedene Orte in eine erste Pupille (Scanner X) der Mikroskopanordnung fokussiert. Im weiteren Strahlengang wird die Pupille (Scanner X) der Mikroskopanordnung (entspricht einer zur rückwärtigen Brennebene des Objektivs konjugierten Ebene) über die Scanoptik SO, die Tubuslinse TL in die Objektivpupille P1 abgebildet. Durch das Objektiv O

erfolgt die Beleuchtung der Probe PR im Weitfeld mit 2 Teilstrahlen unter einem kleinen Winkel, so dass in der Probe eine Intensitätsmodulation, d.h. sinusförmige Interferenzstruktur entsteht. Die Phasenlage der sinusförmigen Struktur kann mit Hilfe des Scanners X in Richtung der Probenebene verschoben werden. Durch eine Phasenverschiebung der Struktur senkrecht zur optischen Achse können unterschiedliche Projektionsszenarien erhalten werden. Für diese verschiedenen Projektionsszenarien erfolgt die Detektion von Phasenbildern mit einer Kamera im Zwischenbild ZB/DE.

Die Trennung von Anregungs- und Detektionslicht erfolgt mit dem optischen Element MDB, das in Abb. 5B dargestellt ist. MDB ist in dem grau gezeichneten Bereich HR voll verspiegelt. Die weiß gezeichneten Bereiche HT sind hoch transmittierend insbesondere für den Wellenlängenbereich in dem die Probenanregung erfolgen soll. Im einfachsten Falle können die HT Bereiche Löcher in dem sonst verspiegelten Element sein. Durch den HT Bereich werden erfindungsgemäß die 2 Teilstrahlen des Anregungslichts hindurch fokussiert. Das von der Probe auf direktem Wege reflektierte Licht gelangt wiederum insbesondere durch die HT Bereiche hindurch zur Lichtquelle. Das in der Probe diffus gestreute Anregungslicht und / oder angeregte Licht treffen MDB entsprechend der Pupillengröße der Mikroskopoptik auf seiner gesamten Fläche, wobei der auf den HR Bereich treffende Anteil in Richtung TL abgelenkt und zur Beobachtung im Zwischenbild zur Verfügung steht. Es geht bei dieser Anordnung an MDB nur der auf die HT Bereiche fallende Anteil der von der Probe Detektionsstrahlung verloren. Jedoch beträgt das Verhältnis der Flächen von HT zu HR:

$$R = \frac{A_{Pupille} - A_{HT}}{A_{Pupille}} = \frac{r_{Pupille}^2 - 2 \cdot r_{HT}^2}{r_{Pupille}^2}, \text{ wobei der Radius für den HR Bereich in}$$

einem Weitfeldmikroskop typischerweise ca. 5 mm und der HT Bereich ca. <0.5 mm betragen. Somit ergibt sich das Verhältnis und damit für die Effizienz der Strahlaufteilung wellenlängenunabhängig von MDB mit ca. $R=98\%$.

Um streifenfreie, tiefendiskriminierte optische Schnitte berechnen zu können, werden im allgemeinen mindestens 2 Phasenbilder PB bei 0° und 180° benötigt. Diese Phasenbilder (PB) werden anschließend zu einem

(konfokalen) optischen Schnittbild in einem Image Prozessor verrechnet und auf einem Monitor dargestellt.

3. Linienscanner

Abb. 6A zeigt schematisch die erfindungsgemäße Anordnung für einen Linienscanner. Die durchgezogenen Linien stellen den Beleuchtungsstrahlengang dar. Bei einem Linienscanner wird die Probe mit einem Linienfokus z.B. entlang der X-Koordinate beleuchtet, die in der Koordinate senkrecht zur Linie verschoben wird. Hierzu wird die Lichtquelle LQ in eine Zwischenbildebene ZB1 der Mikroskopeinrichtung mittels einer Optik L1 linienförmig fokussiert. Durch die Fokussierung mit L1 in Y- Richtung in ZB1, beispielsweise durch eine Zylinderlinse in die Probenebene ergibt sich eine beugungsbegrenzte linienförmige Intensitätsverteilung entlang X auf der Probe. Die linienförmige Intensitätsverteilung entlang X auf der Probe kann weiterhin durch diffraktive oder holographische Elemente nach dem Stand der Technik (Lit.: „Diffractive optics improve product design“, Photonics Spectra, Laurin Publishing Co., Inc. September 1995) erfolgen. Weiterhin kann eine so genannte Powell Linse, wie sie in US 4,826,299 beschrieben ist, eingesetzt werden. Letzteres Element erzeugt im Vergleich zur Zylinderlinse bei gaussförmiger Beleuchtungsintensitätsverteilung, wie sie z.B. für singlemodige Laser typisch ist, eine homogenere Intensitätsverteilung entlang der Linie. Die Powell Linse und die diffraktiven bzw. holographischen Elemente werden hierzu beispielsweise in einer Pupillenebene der Mikroskopvorrichtung besonders vorteilhaft zwischen Lichtquelle und Scanner angeordnet. Mit einer weiteren Optik L3 wird das Licht in die Pupille P1 der Mikroskopanordnung abgebildet. In den Pupillenebenen der Mikroskopanordnung ergibt sich jeweils ein Linienfokus entlang der Y-Achse. Die Pupillenebenen P1 und der Scanner (y – P3) sind zueinander und zur rückwärtigen Brennebene des Objektiv (P3) konjugierte Pupillenebenen der Mikroskopanordnung, so dass der Scanner die linienförmige und beugungsbegrenzt fokussierte Intensitätsverteilung senkrecht zu dieser bewegen kann (y-Koordinate in der Probe). Die Abbildung von ZB1 in die Probe erfolgt über die Scanoptik (SO), die Tubuslinse (TL) und das Objektiv (O). Die Relayoptik (RL1) erzeugt die konjugierten Pupillenebenen P1 und P2

der Mikroskopanordnung. Die Relayoptik kann in speziellen Anordnungen nach dem Stand der Technik auch weggelassen werden. Z.B. kann sie bei einer Verkürzung des Abstandes zwischen P1 und P2 entfallen. Weiterhin kann auch direkt das Element MDB in P1, angebracht auf einem Scanner, zum Scannen des Linienfokus in Y-Richtung verwendet werden. Bei dieser Anordnung kann die Relayoptik und damit die Pupillenebene P2 komplett entfallen. Die transmittive Optik L1 zur Formung der Linie kann prinzipiell auch durch ein reflektives Element z.B. Zylinderspiegel ersetzt werden, dessen Brennpunkt auf P1 liegt. Der Zylinderspiegel wird unter 45° in der in Abb. 6A gezeichneten xz-Ebene angeordnet. In dieser Ebene besitzt der Spiegel auch seine fokussierende Wirkung. Weiterhin wird durch den Spiegel der Strahlweg zur Lichtquelle um 90° abgewinkelt. Der Beobachtungsstrahlengang, z.B. bei einer Fluoreszenzanregung, ist gestrichelt eingezeichnet.

Aufgrund der Art der Probenwechselwirkung z.B. bei einer Fluoreszenz- oder Lumineszenzanregung ist das von der Probe emittierte Licht von geringer räumlicher Kohärenz. D.h. jeder in der Probe angeregte Punkt strahlt im wesentlichen unabhängig von den benachbarten Punkten als Punktstrahler in alle Raumrichtungen ab. Die Optik O (z.B. ein Mikroskopobjektiv) bildet die einzelnen Punktstrahler gemeinsam mit der Tubuslinse TL in eine Zwischenbildebene ZB der Mikroskopeinrichtung ab, wobei die Pupille P gleichförmig von zueinander im wesentlichen inkohärenten Wellenfronten verschiedener Ausbreitungsrichtung ausgeleuchtet wird (gestrichelter Strahlengang). Im Anschluß wird das Licht der Probe mit Hilfe einer abbildenden Optik (PO) bei konfokaler Detektion durch eine Schlitzblende (SB) (Lage - Schlitz Längsrichtung in X-Richtung auf der Zeichnung) fokussiert, wodurch Detektionslicht, das außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannten Detektion kann die Blende entfallen. Hinter der Schlitzblende befindet sich ein Zeilen- oder Flächendetektor (DE) (Lage der Zeile in X-Richtung) der orts aufgelöst (entlang des Linienfokus), der die in der Probe angeregte und/oder rückgestreute Lichtstrahlung detektiert. Der Linienfokus wird mit dem Galvoscanter (y) in einer Raumrichtung abgerastert. Bei Aufnahme einer Fluoreszenz oder Lumineszenz wird zur Unterdrückung des von der Probe

rückgestreuten Anregungslichts ein Emissionsfilter (dichroitischer Filter) F eingeschwenkt.

In der Pupille P1 befindet sich das in Abb. 6B dargestellte Element MDB, welches die Trennung des Anregungs- vom Detektionslicht vornimmt.

Aus Gründen der Veranschaulichung ist das Element MDB vergrößert dargestellt.

MDB ist in dem grau gezeichneten Bereich HR voll verspiegelt. Der weiß gezeichnete Bereich HT ist hoch transmittierend insbesondere für den Wellenlängenbereich in dem die Probenanregung erfolgen soll. Die äußere Berandung des MDB stellt den Pupillendurchmesser der Mikroskopeinheit dar. Im einfachsten Falle kann der HR Bereich ein schmaler Spiegel sein. Auf den HR Bereich wird erfindungsgemäß das Anregungslicht fokussiert. Das von der Probe auf direktem Wege reflektierte Licht gelangt wiederum insbesondere auf den HR Bereich zur Lichtquelle. Das in der Probe diffus gestreute Anregungslicht und / oder angeregte Licht treffen MDB entsprechend der Pupillengröße der Mikroskopoptik auf seiner gesamten Fläche, wobei der auf den HT Bereich treffende Anteil zur Beobachtung im Zwischenbild SB/DE gelangt. Es geht bei dieser Anordnung an MDB nur der auf den HR Bereich fallende Anteil der Detektionsstrahlung verloren. Das Verhältnis der Flächen von HT zu HR beträgt:

$$R = \frac{A_{Pupille} - A_{HT}}{A_{Pupille}} = \frac{\pi \cdot r_{Pupille}^2 - 2 \cdot b_{HT} \cdot r_{Pupille}}{\pi \cdot r_{Pupille}^2}, \text{ wobei der Pupillenradius für den HT}$$

Bereich in einem Mikroskop typischerweise ca. 5 mm und die Breite des HR Bereich ca. $b_{HT} < 0.25$ mm betragen. Somit ergibt sich das Verhältnis und damit für die Effizienz der Strahlaufteilung von MDB wellenlängenunabhängig $R=97\%$.

4. Strukturierter Linienscan – Descannt

Abb. 7A zeigt schematisch die erfindungsgemäße Anordnung für einen Linienscanner mit strukturierter Beleuchtung. Die durchgezogenen Linien stellen den Beleuchtungsstrahlengang dar. Bei einem Linienscanner mit strukturierter Beleuchtung wird die Probe mit einem Linienfokus beleuchtet, die in der Koordinate senkrecht zur Linie verschoben wird. Die Intensität variiert entlang der Linie periodisch. Hierzu wird die Lichtquelle LQ durch ein

optisches Element, z.B. Fresnelsches Biprisma in 2 Teilstrahlen (T1/T2) aufgespalten, die sich in einer Zwischenbildebene ZB1 der Mikroskopeinrichtung in der XZ-Ebene schneiden und in die Ebene des MDB fokussiert werden. Weitere Methoden zur Strahlaufspaltung sind aus dem Stand der Technik bekannt. Zusätzlich wird mit einer weiteren Optik L1 das Licht in ZB 1 linienförmig fokussiert. L1 ist hierbei identisch dem Anhand von Abb. 6A beschriebenen Element L1. Durch die Fokussierung in Y- Richtung in ZB1 ergibt sich eine beugungsbegrenzte strukturierte linienförmige Intensitätsverteilung entlang X auf der Probe.

Mit einer weiteren Optik L3 wird das Licht in die Pupille P1 der Mikroskopanordnung abgebildet. In den Pupillenebenen der Mikroskopanordnung ergeben sich jeweils zwei Linienfoki entlang der Y-Achse. Die Pupillenebenen P1 und die zwei Scanner (y – P3) und (x - P2) sind zueinander und zur rückwärtigen Brennebene des Objektivs (P4) konjugierte Pupillenebenen der Mikroskopanordnung, so dass die Scanner die strukturierte linienförmige und beugungsbegrenzt fokussierte Intensitätsverteilung entlang X senkrecht bzw. entlang dieser bewegen (y-Koordinate, bzw. x-Koordinate in der Probe). Die Abbildung von ZB1 in die Probe erfolgt über die Scanoptik (SO), die Tubuslinse (TL) und das Objektiv (O). Die Relayoptiken (RL1 und RL2) erzeugen die konjugierten Pupillenebenen P1 bis P3 der Mikroskopanordnung. Die Relayoptiken können in speziellen Anordnungen nach dem Stand der Technik auch weggelassen werden. Z.B. kann sie bei einer Verkürzung des Abstandes zwischen P2 und P3 entfallen. Weiterhin kann auch direkt das Element in P1 zum Scannen entlang des Linienfokus in X bzw. Y-Richtung verwendet werden. Bei dieser Anordnung kann dann die Pupillenebene P2 bzw. P3 komplett entfallen.

Der Beobachtungsstrahlengang, z.B. bei einer Fluoreszenzanregung, ist gestrichelt eingezeichnet und ist analog dem bereits Anhand von Abb. 6A beschriebenen.

In DE befindet sich wiederum ein Zeilen- oder Flächendetektor (DE) (Lage der Zeile in X-Richtung) der orts aufgelöst (entlang des Linienfokus) das Detektionslicht detektiert. Bei Aufnahme einer Fluoreszenz oder Lumineszenz

wird zur Unterdrückung des von der Probe rückgestreuten Anregungslichts ein Emissionsfilter (dichroitischer Filter) F eingeschwenkt.

In der Pupille P1 befindet sich das in Abb. 7B dargestellte Element MDB, welches die Trennung des Anregungs- vom Detektionslicht vornimmt. MDB ist in den grau gezeichneten Bereichen HR voll verspiegelt. Der weiß gezeichnete Bereich HT ist hoch transmittierend insbesondere für den Wellenlängenbereich in dem die Probenanregung erfolgen soll. Die äußere Berandung des MDB stellt den Pupillendurchmesser der Mikroskopeinheit dar. Der Abstand a ergibt sich aus der Winkelaufspaltung der beiden Teilstrahlen an FBP und beträgt zirka 1 mm je nach Ausbildung der optischen Anordnung. Auf die HR Bereiche werden erfindungsgemäß die beiden Teilstrahlen des Anregungslichts fokussiert. Das von der Probe auf direktem Wege reflektierte Licht gelangt wiederum insbesondere auf die HR Bereiche zur Lichtquelle. Das in der Probe diffus gestreute Anregungslicht und / oder angeregte Licht treffen MDB entsprechend der Pupillengröße der Mikroskopoptik auf seiner gesamten Fläche, wobei der auf den HT Bereich treffende Anteil zur Detektion im Zwischenbild SB/DE gelangt. Es geht bei dieser Anordnung an MDB nur der auf die HR Bereiche fallende Anteil der Detektionsstrahlung verloren. Das Verhältnis der Flächen von HT zu HR beträgt:

$$R = \frac{A_{Pupille} - A_{HT}}{A_{Pupille}} \approx \frac{\pi \cdot r_{Pupille}^2 - 4 \cdot b_{HT}}{\pi \cdot r_{Pupille}^2}, \text{ wobei der Pupillenradius für den HT}$$

Bereich in einem Mikroskop typischerweise ca. 5 mm und die Breite des HR Bereich ca. $b_{HT} < 0.25$ mm betragen. Somit ergibt sich das Verhältnis und damit für die Effizienz der Strahlaufteilung von MDB $R=94\%$.

Um streifenfreie, tiefendiskriminierte optische Schnitte berechnen zu können, werden im allgemeinen mindestens 2 Phasenbilder PB bei 0° und 180° benötigt. Die Phasenbilder werden mit dem Y-Scanner bei verschiedenen Stellungen des X-Scanners erzeugt. Diese Phasenbilder (PB) werden anschließend zu einem (konfokalen) optischen Schnittbild in einem Image Prozessor verrechnet und auf einem Monitor dargestellt. Die Schlitzblende kann hierbei prinzipiell auch entfallen, da die Modulationstiefe der optischen

Abbildung des strukturierten Linienfokus als Kriterium für die Tiefenschärfe dient.

In Abb. 7 erfolgt beispielhaft die Erzeugung einer strukturierten Scanlinie statt mit zwei interferierenden Teilstrahlen mit einem der Lichtquelle und L1 nachgeordneten Liniengitter G (Anordnung nach 7A2), das sich beispielsweise im Zwischenbild ZB1 befindet und einen sinusförmigen Intensitätsverlauf besitzt. Über L3 erfolgt die Abbildung der an G erzeugten Raumfrequenzen in die Ebene des MDB (Pupillenebene).

5. Strukturierter Linienscan – teildescannt

Abb. 8A zeigt eine erfindungsgemäße Anordnung bei der das Detektionslicht nur in einer Koordinate descannt wird, d.h. nur über den Y-Scanner läuft. Dies hat den Vorteil, dass die Anzahl der optischen Elemente im Beobachtungsstrahlengang verringert werden können. Der Beleuchtungsstrahlengang ist analog zu dem in Abb. 7A. Lediglich beim Element MDB (siehe Abb. 8B) sind die HT und HR Bereiche im Vergleich zur Darstellung in 7b vertauscht. Das Anregungslicht wird durch 2 Schlitze hindurch fokussiert. Das zu beobachtende Licht der Probe wird am MDB P1 seitlich ausgespiegelt und mit einem in ZB angeordneten Detektor DE detektiert.

6. Strukturierter Linienscan – nicht descannt

Abb. 9 zeigt eine weitere erfindungsgemäße Anordnung bei der das Detektionslicht nicht descannt wird, d.h. über keinen Scanner läuft sondern mittels einer CCD Kamera in einem Zwischenbild (z.B. TV-Port eines Mikroskops) gemessen wird. Dies hat den Vorteil, dass die Anzahl der optischen Elemente im Beobachtungsstrahlengang beträchtlich verringert werden können. Weiterhin können spezielle CCD-Kameras wie z.B. zeitgegate Kameras zur 3D aufgelösten Messung der Fluoreszenzlebensdauer eingesetzt werden. Der Beleuchtungsstrahlengang ist analog zu dem in Abb. 8A. Das zu beobachtende Licht der Probe wird am MDB P1 seitlich ausgespiegelt und mit einem in ZB angeordneten Detektor DE detektiert.

In allen erfindungsgemäßen Anordnungen können die Reflexionseigenschaften der Bereiche HT und HR auch vertauscht werden, so dass der HR Bereich in diesem Falle hoch transmittiv ist. In diesem Falle muß der Strahlengang am MDB von der Lichtquelle LQ aus mit dem vom MDB bis zum Detektor DE vertauscht werden. Weiterhin kann das Element bei Verwendung von polarisiertem Anregungslicht auch aus einem Polarisationsselement bestehen. Die Funktion wird beispielhaft anhand von Abb. 7 erläutert. Hier wird das Anregungslicht an MDB in den HR Bereichen reflektiert. Bei Verwendung von polarisiertem Anregungslicht können anstatt von Spiegeln in den HR Bereichen auch Polarisationssteiler angeordnet werden. Durch den Einsatz von Polarisationsselementen geht im HR Bereich nur noch 50% des Detektionslichts verloren.

Die Anordnungen in den Abb. 6 bis 9 eignen sich auch für das Scannen von Regionen besonderen Interesses ROI (siehe EP977069A2). Hierbei wird das Laserlicht nur für bestimmte durch den Nutzer vorgewählte Regionen freigegeben.

Die Länge der Beleuchtungslinie (entlang der X-Koordinate) kann beispielsweise durch eine Änderung der effektiven Brennweite von L3 (siehe z.B. in Abb. 7) erfolgen. Dies resultiert in einer Veränderung des Abbildungsmaßstabs der Mikroskopanordnung. Die Veränderung der Brennweite kann insbesondere durch eine adaptive Optik besonders schnell erfolgen. Eine weitere Möglichkeit der Linienbeeinflussung besteht in dem Abschneiden der Linie in ZB1 durch eine einstellbare mechanische Blende oder zwei Einzelschneiden, deren Breite einstellbar ist. Zusätzlich kann durch die Verschiebung von L1 senkrecht zur optischen Achse in ZB1, der Blende oder durch den X-Scanner die Lage des Linienausschnitts in der Probe beeinflusst werden. Somit können beliebige durch den Nutzer vordefinierte Regionen in der Probe mit unterschiedlichen Anregungslichtleistungen beaufschlagt werden.

Der Vorteil dieses Verfahren gegenüber dem Verfahren nach dem Stand der Technik ist, dass die ROIs in Echtzeit gescannt werden können. Abb. 10 zeigt beispielhaft ein ROI in einem Scanfeld. Schwarz eingezeichnet ist der beleuchtete Bereich. Die Ansteuerung der Scanner X und Y und der Blende bzw. des MDB erfolgt in Kombination mit dem Element zum Einstellen der Lichtleistung, entsprechend der zu untersuchenden ROI. Das Scanfeld stellt den gesamten potentiell mit der Anordnung untersuchbaren Ausschnitt der Probe dar.

Grundsätzlich kann die Funktion der dargestellten Scanner zumindest in einer Ebene auch durch einen entsprechenden Scantisch (Objektscanner) ersetzt werden.

Patentansprüche

1.

Anordnung zur optischen Erfassung von in einer Probe angeregter und/ oder rückgestreuter Lichtstrahlung, wobei die Probenbeleuchtung in eine und/oder in die Nähe einer Pupillenebene des Strahlenganges zwischen Probenebene und Erfassungsebene fokussiert wird und in dieser Ebene Mittel zur räumlichen Trennung des Beleuchtungslichtes vom Detektionslicht vorgesehen sind.

2.

Anordnung nach Anspruch 1, wobei von der Probe kommendes Fluoreszenzlicht und/ oder Lumineszenzlicht und / oder Phosphoreszenzlicht und/ oder diffus gestreutes Beleuchtungslicht detektiert wird.

3.

Anordnung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Mittel zur räumlichen Trennung aus zumindest einem reflektierenden ersten Abschnitt und zumindest einem transmittierenden zweiten Abschnitt bestehen, wobei der reflektierende Abschnitt für die Einkopplung des Beleuchtungslichtes dient und der transmittierende Abschnitt für den Durchgang des Detektionslichtes in Richtung der Detektion oder der transmittierende für die Einkopplung des Beleuchtungslichtes und der reflektive für die Auskopplung des Detektionslichtes dient.

4.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein Strahlteiler vorgesehen ist, der einen zentralen Abschnitt aufweist, der reflektierend oder transmittierend ausgebildet ist und der von einem zweiten Abschnitt umgeben ist, der transmittierend oder reflektierend ausgebildet ist.

5.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Strahlteiler als Polteiler ausgebildet ist.

6.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mit dem Strahlteiler gescannt wird

7.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit Schrägbeleuchtung für ein Weitfeldmikroskop.

8.

Anordnung nach Anspruch 7, wobei eine senkrecht zur optischen Achse verschiebbliche Linse vorgesehen ist.

9.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein Weitfeldmikroskop mit strukturierter Beleuchtung vorgesehen ist.

10.

Anordnung nach Anspruch 9, wobei eine tiefenaufgelöste Erfassung der Probe erfolgt.

11.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, in einem Laser-Scanning – Mikroskop.

12.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein Linienscanner vorgesehen ist.

13.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Scanlinie mit strukturierter Beleuchtung überlagert wird.

14.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Länge der Linie durch Variation der Brennweite und / oder des Abbildungsmaßstabs einer Mikroskopanordnung variiert wird

15.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Länge der Linie mittels adaptiver Optik variiert wird

16.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Länge der Linie durch eine verstellbare Blende im Zwischenbild variiert wird.

17.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit descannter Detektion.

18.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit teildescannter Detektion in einer Richtung.

19.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit nicht descannter Detektion.

20.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Detektion mit einer CCD Kamera erfolgt.

21.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Abtastung und / oder Detektion ausgewählter Probenbereiche erfolgt.

[illegible]

Anordnung zur optischen Erfassung von in einer Probe angeregter und/ oder rückgestreuter Lichtstrahlung in einem Mikroskop, wobei die Probenbeleuchtung in eine und/oder in die Nähe einer Pupillenebene des Strahlenganges zwischen Probenebene und Erfassungsebene fokussiert wird und in dieser Ebene Mittel zur räumlichen Trennung des Beleuchtungslichtes vom Detektionslicht vorgesehen sind, wobei insbesondere von der Probe kommendes Fluoreszenzlicht und/ oder Lumineszenzlicht und / oder Phosphoreszenzlicht und/ oder diffus gestreutes Beleuchtungslicht detektiert wird und die Mittel zur räumlichen Trennung vorteilhaft aus zumindest einem reflektierenden ersten Abschnitt und zumindest einem transmittierenden zweiten Abschnitt bestehen, wobei der reflektierende Abschnitt für die Einkopplung des Beleuchtungslichtes dient und der transmittierende Abschnitt für den Durchgang des Detektionslichtes in Richtung der Detektion oder der transmittierende für die Einkopplung des Beleuchtungslichtes und der reflektive für die Auskopplung des Detektionslichtes dient.